PP2A 阻害法を用いるオカダ酸群測定キット及び ELISA 法による イエッソトキシン群測定キットの実証試験結果

The Results of Detection of the Okadaic Acids Using PP2A Obstruction Method and the Yessotoxins Using ELISA Method.

千葉　美子　　福原　郁子　　柳田　則明*
Yoshiko CHIBA，Ikuko FUKUHARA，Noriaki YANAGITA

キーワード：下痢性貝毒（DSP）；プロテインフォスファターゼ 2A（PP2A）；オカダ酸（OA）群；酵素免疫測定（ELISA）；イエッソトキシン（YTX）群
Key words：diarrhetic shellfish poison；protein phosphatase 2A；okadaic acids；enzyme-linked immunosorbent assay；yessotoxins

1　はじめに

下痢性貝毒の我が国の公定試験法はマウス毒性試験を採用しており，可食部 1g 当たり 0.05MU を規制値としている。しかし下痢性貝毒は，化学構造の違いによりオカダ酸（okadaic acid：OA）群，イエッソトキシン（yessotoxin：YTX）群，ペクテノトキシン（pectenotoxin：PTX）群の 3 群に分けられ，EU の新規制では可食部 100g 当たり OA 群 16μg，YTX 群 100μg，PTX 群 16μg と個別の基準が設けられている。そのため，EU ではマウス毒性試験法のほかに HPLC 法，LC/MS 法，ELISA 法等も検査法として認められ，近年は動物愛護の観点からも動物試験に依存しない貝毒分析法の開発が各国で進められている。

我が国では平成 16 年度から 18 年度まで，農林水産省のプロジェクト研究「現場即応型貝毒検出技術と安全な貝毒モニタリング体制の開発」が（独）水産総合研究センターを中核機関とし，東北大学，北里大学，大阪府立公衆衛生研究所，（財）日本食品分析センターを共同研究機関として実施された。この研究の目的は，生産現場で二枚貝の下痢性貝毒及び麻痺性貝毒を簡便かつ迅速に検査できる簡易測定キットを開発するとともに，簡易測定キットを生産現場の貝毒モニタリング体制に導入することにある。

（財）日本食品分析センターでは下痢性貝毒の簡易測定法開発を担当しており，当部ではそれにより開発された OA 群及び YTX 群測定キット（いずれも試用品）を用いた実証試験に参加した。

また，簡易測定キットの性能を詳細に評価するため，（独）水産総合研究センター東北区水産研究所が行った LC/MS/MS による個別の貝毒成分測定結果を併せて報告する。

2　方　法

2.1　測定実施項目

下痢性貝毒成分のうち OA 群及び YTX 群

*　現　石巻保健福祉事務所

2.2　試料及び前処理法

試験品として収去検査を終了した可食部の残品（全量をホモジナイズして均質化したもの）を－ 30℃で保存し，試験品の規定保存期間（3 ヶ月）終了後の二枚貝類 26 検体（あさり 11 件，ほたて 6 件，かき 9 件）を試料として用いた。

前処理は，凍結保存試料を解凍し均一化した後，図 1 により検体抽出液を調製し，使用時まで－ 30℃で冷凍保存した。

2.3　測定方法

2.3.1　オカダ酸群測定方法

OA 群の構造式を図 2 に示した。このキットは，OA を指標として検体中の OA 群を測定する。測定用試料溶

均質化試料 2g 秤量（50mL 容チューブ）
↓
90% メタノール 18mL 添加
↓
ホモジナイズ 1 分間
↓
遠心分離 2,500rpm，10 分間
↓
上清を分取（15mL 容チューブ）
↓
検体抽出液

図 1　検体抽出液の調製方法 [1), 2)]

	R_1	R_2	R_3
okadaic acid（OA）	H	Me	H
dinophysistoxin1（DTX1）	H	Me	Me
dinophysistoxin2（DTX2）	H	H	Me
dinophysistoxin3（DTX3）	acyl	Me	Me

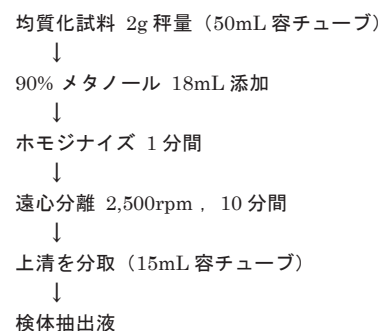
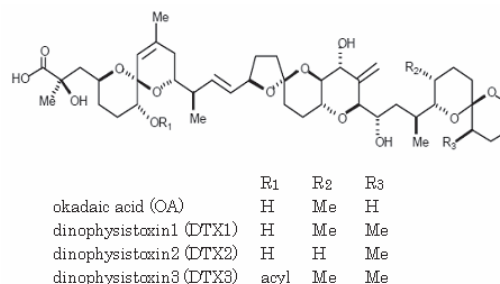
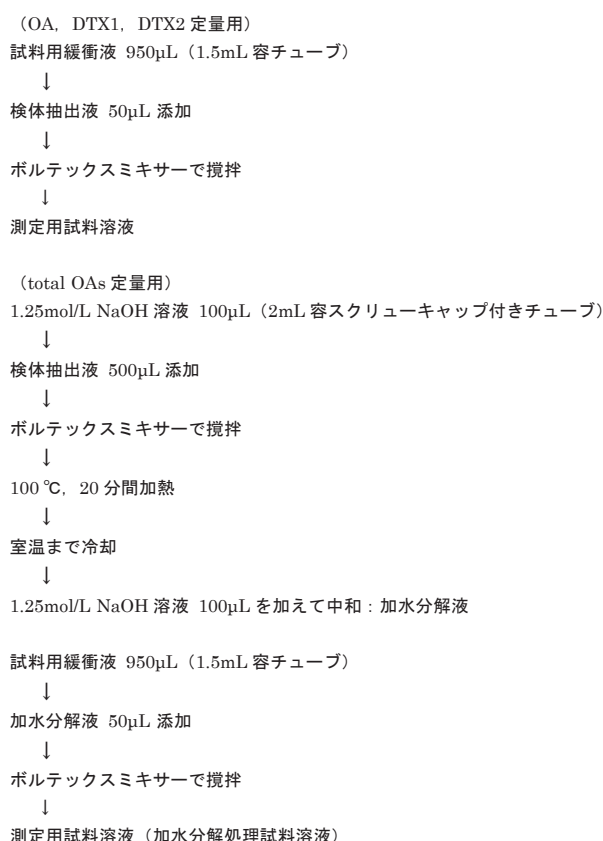
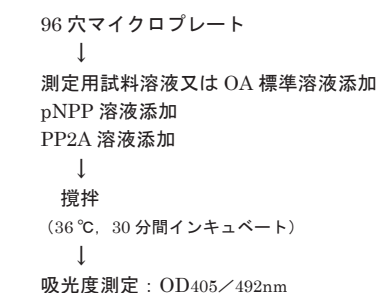



図 2　オカダ酸群構造式

液の調製方法を図3に，OA群測定フローを図4に示した。測定溶液中のOA相当量として0.10ng/ml，試料中では0.10μg/gから測定可能で，エステル型OAを含む検体は，アルカリ加水分解処理をすることによりOA総量として求めることもできる。ただし，この場合の定量下限値は0.14μg/gとなる。また，OA群（OA，DTX1及びDTX3の加水分解物）以外のその他の主要な脂溶性貝毒（PTX6，YTX）は，このキットで使用しているPP2Aに対する阻害活性が極めて低いため，試料中の濃度に換算して2μg/g程度までは測定に影響がないことが確認されている。

2.3.2　イエッソトキシン群測定方法

YTXの構造式を図5に示した。このキットは間接競合ELISA法を利用し，YTXを指標として検体中のYTX群を測定する。測定用試料溶液の調製方法を図6に，YTX群測定フローを図7に示した。測定溶液中のYTX相当量として0.10μg/gから測定可能で，YTX群（YTX，45OH-YTX）以外の下痢性貝毒（OA群）及び他の主要な脂溶性貝毒（PTX6）は，このキットで使用している抗YTX抗体に対する交差性が極めて低いため，試料中の濃度に換算して10μg/g程度までは測定に影響がないことが確認されている。ただし45OH-YTXは，YTXに比べ8～15倍高くこのキットの抗体と反応するため，LC/MS法に比べ約8～15倍程度高い測定値となる。なお，主に海外で検出されるhomo-YTX等に対する抗体の交差性については，同等であると推定されるが検討中である。

（OA，DTX1，DTX2定量用）
試料用緩衝液 950μL（1.5mL容チューブ）
↓
検体抽出液 50μL添加
↓
ボルテックスミキサーで撹拌
↓
測定用試料溶液

（total OAs定量用）
1.25mol/L NaOH溶液 100μL（2mL容スクリューキャップ付きチューブ）
↓
検体抽出液 500μL添加
↓
ボルテックスミキサーで撹拌
↓
100℃，20分間加熱
↓
室温まで冷却
↓
1.25mol/L NaOH溶液 100μLを加えて中和：加水分解液

試料用緩衝液 950μL（1.5mL容チューブ）
↓
加水分解液 50μL添加
↓
ボルテックスミキサーで撹拌
↓
測定用試料溶液（加水分解処理試料溶液）

図3　オカダ酸群測定用試料溶液の調製方法[1)]

96穴マイクロプレート
↓
測定用試料溶液又はOA標準溶液添加
pNPP溶液添加
PP2A溶液添加
↓
撹拌
（36℃，30分間インキュベート）
↓
吸光度測定：OD405／492nm

図4　オカダ酸群測定フロー[1)]

NaO3SO … Me … HO … OH … yessotoxin(YTX)

図5　イエッソトキシン構造式

試料用緩衝液 960μL（1.5mL容チューブ）
↓
検体抽出液 40μL添加
↓
ボルテックスミキサーで撹拌
↓
測定用試料溶液

図6　イエッソトキシン群測定用試料溶液の調製方法[2)]

96穴マイクロプレート
↓
YTX-OVA結合体の固相化
（冷蔵，一晩以上）
↓ 洗浄
ブロッキング
（室温又は36℃，2時間以上）
↓ 洗浄
競合免疫反応
測定用試料溶液又はYTX標準溶液添加
抗YTX血清（一次抗体）添加
（36℃，1時間インキュベート）
↓ 洗浄
酵素標識抗ウサギIgG抗体（二次抗体）添加
（36℃，30分間インキュベート）
↓ 洗浄
酵素基質液添加
↓
酵素基質反応，発色
（36℃，10分間インキュベート）
↓
発色停止
↓
吸光度測定：OD450／630nm

図7　イエッソトキシン群測定フロー

3　結果と考察

3.1　公定法による検査結果

公定法による下痢性貝毒及び麻痺性貝毒の検査結果を表1に示した。

3.2　オカダ酸群及びイエッソトキシン群のキットによる測定結果

OA（エステル型OA及びOA総量）群濃度，YTX群濃度をそれぞれのキットを用いて測定した結果及び（独）水産総合研究センター東北区水産研究所が実施したLC/MS/MSによる測定結果（定量下限値:0.015μg/g，検出下限値：0.005μg/g）を表2に示した。

4　まとめ

「PP2A阻害法を用いるオカダ酸群測定キット」及び「ELISA法によるイエッソトキシン群測定キット」の実証試験により，二枚貝の可食部濃度を測定した結果，OA総量として26件中1検体から0.14μg/g，YTX群は26検体中8件から0.10μg ～ 0.37μg/gの濃度範囲で検出した。これらは，いずれも公定法では検出下限値未満の検体であった（公定法0.05MU/gは，OA群濃度として約0.2μg/g，YTX群濃度として約0.1μg/gに換算される）。YTX群は公定法での抽出操作中に，水溶性物質（麻痺性貝毒等）と共に大部分が除去されることが確認されており，公定法では検出できなかったYTX群を検出したと思われた。LC/MS/MSでの測定結果は，YTX群のみ7件から検出され，その濃度はキットより約10倍程度低い値を示したことから450H-YTXの存在が推測された。今回の実証試験では，試料として中腸腺ではなく可食部全体を用いたため感度が悪く，検出検体数が少なかったため相関を見るまでには至らなかった。全国的なデータでは両キット共LC/MS法との高い相関が認められ[3]，スクリーニング法として十分利用可能であると考えられた。

謝　辞

この度のコラボレーションに参加させて頂いた（財）日本食品分析センターの関係各位に深謝いたします。

引用文献

1) （財）日本食品分析センター：Protein Phosphatase 2A（PP2A）阻害法を用いたオカダ酸群測定キットの実証試験のための取扱説明書（2006年9月）

2) （財）日本食品分析センター：酵素免疫測定（Enzyme-Linked Immunosolbent Assay：ELISA）法を用いたイエッソトキシン群測定キットの実証試験のための取扱説明書（2006年9月）

3) （独）水産総合研究センター東北区水産研究所：先端技術を活用した農林水産省研究高度化事業「現場即応型貝毒検出技術と安全な貝毒モニタリング体制の開発」，平成16年度研究成果選，2（平成17年8月）

表1　公定法による測定結果

貝種	下痢性貝毒	麻痺性貝毒
あさり	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
ほたて	＜0.05	＜1.91
かき	＜0.05	＜1.91
かき	＜0.05	＜1.91
かき	＜0.05	＜1.91
ほたて	＜0.05	＜1.91
かき	－	14
かき	－	18
かき	－	12
かき	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
ほたて	＜0.05	2.1
あさり	＜0.05	＜1.91
ほたて	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
ほたて	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
ほたて	＜0.05	＜1.91
あさり	＜0.05	＜1.91
かき	＜0.05	＜1.91
かき	＜0.05	＜1.91

（単位：MU/g可食部）

表2　キット及びLC/MS/MSによるオカダ酸群，イエッソトキシン群の測定結果

OA群		YTX群	OA群	YTX群
加水分解なし	加水分解あり			
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	0.10	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	0.11	N.D.	0.0186
＜0.1	＜0.14	0.29	N.D.	0.0240
＜0.1	＜0.14	0.23	N.D.	0.0167
＜0.1	＜0.14	0.15	N.D.	0.0202
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	0.18	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	0.37	N.D.	0.0395
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	0.0242
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.
＜0.1	＜0.14	0.21	N.D.	0.0097
＜0.1	＜0.14	＜0.1	N.D.	N.D.

キットによる測定結果　（μg/g可食部）　LC/MS/MS測定結果（μg/g可食部）